

## 소백혈병 바이러스 (Bovine Leukemia Virus)에 감염된 한국 재래산양에서 PCR기법을 이용한 BLV 유전자 검출

충남대학교 수의과대학, <sup>1</sup>수의과학연구소

전무형 · 장경수 · 조용성 · 박종현<sup>1</sup> · 안수환<sup>1</sup>

=Abstract=

### Detection of BLV Proviral DNA in Korean Native Goats Experimentally Infected with Bovine Leukemia Virus by Polymerase Chain Reaction

Moo-Hyung Jun, Kyung-Soo Chang, Young-Sung Cho,  
Jong-Hyeon Park<sup>1</sup> and Soo-Hwan An<sup>1</sup>

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea and  
<sup>1</sup>National Veterinary Research Institute, RDA, Anyang 430-016, Korea

PCR amplification using the primers for *gag*, *pol* and *env* genes in BLV (bovine leukemia virus) proviral DNA and syncytium assay were carried out for the Korean native goats experimentally infected with bovine leukemia virus to investigate pathogenesis of BLV in the goats, and to establish a model animal for BLV infection. The oligonucleotide primers used in PCR revealed very high specificity. The minimal amount of FLK-BLV cellular chromosomal DNA to detect the integrated BLV proviral DNA was 10 ng. The peripheral blood lymphocytes from the goat infected with BLV were examined at regular intervals by PCR amplification and syncytium assay. *Pol* or *gag* genes were detected in none of three infected goats at the 1st week post-infection (p.i.). At the 4th week p.i., one of three goats showed the amplified *gag* gene. Thereafter detection rates for the genes were increased, indicating that the BLV proviral genes were integrated in all of the lymphocytes from three goats, at the 16th weeks p.i., when it was evident in syncytium assay that the lymphocytes from all of three goats were infested with infective BLV. Investigating the tissues from the necropsied goats at the 8th month p.i., the amplified BLV proviral genes and infective BLV were detected in all of the peripheral lymphocytes from three infected-goats. Among various tissues examined, the amplified BLV proviral genes were observed in spleen and superficial cervical, mandibular and retropharyngeal lymph nodes, and the infective BLV, in superficial cervical and mandibular lymph nodes. It was assumed that the Korean native goat was quite susceptible to BLV infection, indicating that the goat could be a good model animal for BLV.

**Key Words:** Bovine leukemia virus, Korean native goat, PCR, BLV pathogenesis, experimental infection

## 서 론

소백혈병 (bovine leukosis, BL)은 소의 혈액 중 양성 질병으로 임파계세포의 이상증식이 주증이며, 임상 병리학적 특성에 따라 성우형, 송아지형, 흉선형 및 피부형으로 분류한다. 이 중 발생 빈도가 가장 높은 성우형 (adult form)은 전염성이 있고, 발생이 일정한 지역이나 지리적 조건과 밀접한 관계가 있어 유행성 소백혈병 (enzootic bovine leukosis)이라고도 한다 [1~3]. 또한 본 병은 한번 우군에 감염되면 근절하기가 어렵고, 지속적으로 낙농산업에 손실을 야기하기 때문에 우리나라에서는 2종 법정가축전염병으로 규정하고 있다 [4~6].

유행성 소백혈병의 병원체는 bovine leukemia virus (BLV)로 *Retroviridae*에 속하며 85~120 nm 크기로, plus (+) 외가닥 RNA 핵산과 역전사효소를 가지며, 복제과정중 proviral DNA를 형성하고 5'에서 3' 방향으로 *gag*, *pol*, *env* 및 *pXBL* 유전자를 가지고 있다 [1~3]. 이 proviral DNA는 세포 chromosomal DNA에 결합되어 증식과정에 들어가며 종양유전자 (oncogene)는 가지고 있지 않다 [1~3]. BLV는 B-림파구에 주로 감염하여 세포를 변형시켜 종양을 유발하며, 유전자의 구조와 제반 특성이 human T cell leukemia virus와 매우 유사하다 [1,2,7,8]. 그러나 산발형 소백혈병인 송아지형, 피부형 및 흉선형의 원인체는 아직 밝혀지지 않았다 [1~3].

국내에서는 1968년 이후 본 병에 대한 역학적 조사연구가 여러 학자들에 의해 수행된 바 있고 [4~6], agar-gel immunodiffusion (AGID)법에 의한 전국 젖소에 대한 표본조사에서 항체 양성율은 20~30%로 보고된 바 있으며 [10], 면역확산법에 이용되는 BLV glycoprotein antigen과 core antigen의 제조와 이에 대한 정상연구 및 야외 응용시험이 수행되어 진단용 항원이 개발되었다 [5].

최근 김 등 [8]은 소백혈병에 이환된 젖소를 검색하기 위해 polymerase chain reaction (PCR)과 enhanced chemiluminescence 기법을 이용하여 BLV provirus DNA검출을 위한 실험을 수행한 바 있다. 또한 전 등 [9]은 bovine leukosis tumor-associated antigen (BL-TAA)에 대한 monoclonal antibody를 제조하고, 이를 이용하여 소백혈병 종양 세포를 특이하게 검출할 수 있음을 보고하였다.

BLV의 병인기전을 규명하고 예방에 대한 연구를 수행하기 위해 실험동물 모델개발에 관한 실험이 여러 학자들에 의해 수행된 바 있으며 [10~13], 변양은 감수성이 높고 발암성이 있어 장기간 감염되었을 때 임파성 종양을 유발한다고 보고된 바 있으며 [11], 소, 산양 및 토끼는 감염이 성립되지만 단기간 관찰시 종양을 유발하지 않는다고 보고된 바 있다 [10,12,13].

국내에서는 조 등 [6] 및 이 등 [4]이 우리나라 재래산양에 BLV를 실험적으로 감염시킨 후 BLV에 대한 항체 변동실태 및 혈액상의 변동을 AGID법, 보체의존성 항체 세포 독성시험, 보체 결합반응, syncytium inhibition test를 이용한 바이러스 중화시험, B-림파구 및 BL-TAA의 측정법 등을 이용하여 연구한 결과, 한국 재래산양이 BLV에 대해 감수성이 있음을 밝혔다.

저자 등은 BLV를 인공감염시킨 한국 재래산양에 대해 PCR 기법으로 BLV proviral DNA의 분포상태를 구명함으로써 BLV의 한국 재래산양에 대한 병인기전을 밝힐 자료를 얻고, 또한 한국 재래산양을 BLV 감염 시험모델로 확립하기 위한 기초자료를 얻기위해 본 시험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 바이러스 및 세포배양

산양접종에 공시한 BLV는 BLV persistently infected fetal lamb kidney cell line (FLK-BLV)의 배양상층액을 이용하였으며, PCR 특이성시험을 위해 infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus ( $5 \times 10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.2 ml)를 공시하였다. Syncytium assay (SA)에서 지시세포로는 F81 세포주 (cat cell containing murine sarcoma virus genome) 및 BGK 세포주 (재래산양 신장세포주)를 공시하였다. 세포배양은 Eagle's minimum essential medium (MEM, Gibco BRL, Grand Island, NY)에 우태아 혈청을 1~7%되게 가하고 페니실린 (100 IU/ml), 스트렙토마이신 (100 IU/ml) 및 겐타마이신 (50 µg/ml)을 첨가한 배지를 주로 이용하였다. F81 세포주의 경우는 0.25% lactalbumin과 2 µg/ml 농도의 polybrene을 첨가하여 배양하였다.

### 2. 동물접종

임상적으로 건강한 재래산양 (*Capra hircus*, 6-10Kg, ♂) 5두를 선정하여 2주간의 임상관찰과

적응기간을 거치고 AGID법으로 BLV 항체 음성임을 확인한 다음 3두에는 ml당  $10^{5.5}$ 의 합포체 세포형성능을 가진 FLK-BLV 세포를 복강내에 50 ml, 서혜부 피하에 20 ml씩 각각 접종하였다. 2두는 대조군으로써 MEM을 동일한 방법으로 접종하였다.

### 3. 가검물 채취

경정맥으로부터 경시적으로 혈액을 채취하여 헤파린 처리후 Ficoll-Hypaque densitogradient 법으로 말초임파구를 분리하였다 [4]. 또한 살처분한 염소로부터 비장, 흉선, 간, 신장 및 각 임파절을 채취한 다음 세절하고 인산완충식염액 (PBS, pH 7.2)내에서 교반하고 원심하여 세포를 획득하였으며  $1.5 \times 10^{6.5}$  cells/ml 농도로 조정하여 실험에 공시하였다.

### 4. DNA의 추출

Chromosomal DNA의 추출은 Gatei 등 [14]의 방법에 따라 수행하였다. 요약하면, 준비된 세포를 nuclei lysis buffer [10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 8.2)]를 이용하여 용해하였으며, 이어서 세포용해액에 10% sodium dodecyl sulfate 0.2 ml과 proteinase K 용액 (1 mg in 1% SDS-2 mM EDTA) 0.5 ml를 가하여 37°C에서 18시간 소화시켰다. 소화 후, 6 M NaCl 1 ml를 가하여 원침에 의해 단백질을 제거하였다. 그리고 2 Vol의 에타놀을 가하여 DNA를 침전시키고 난 뒤 10 mM Tris-HCl-0.2 mM EDTA (pH 7.5)에 용해시켰으며, DNA 농도는  $A_{260}$  (Spectronic Genesys 5, Milton Roy, Rochester, NY)에서 측정하였다.

### 5. Oligonucleotide primer의 합성

PCR용 primer는 Sagata 등 [15,16]이 보고한 BLV

provirus sequence의 *gag*, *pol* 및 *env* gene 영역의 conserved region (sense 및 antisense sequence)을 택하여 합성된 것을 수의과학연구소와 북해도대학 수의학부로부터 분양받아 공시하였으며, 성상은 Table 1과 같다.

### 6. PCR에 의한 DNA 증폭

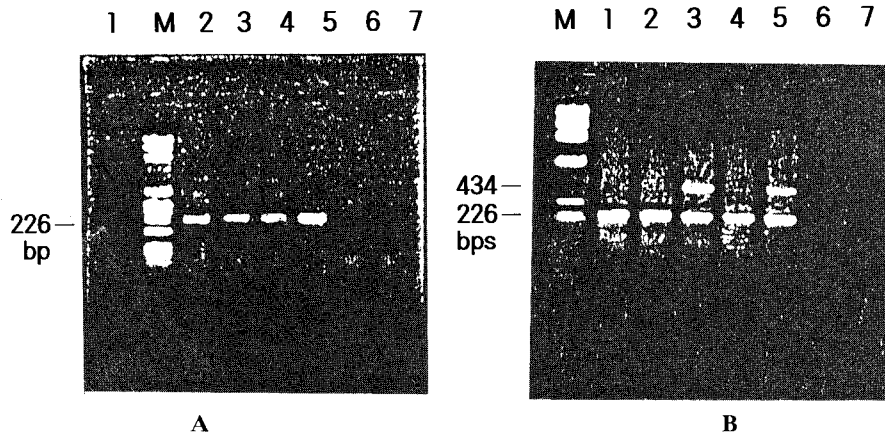
실험동물의 말초임파구와 여러 실질 장기에 대해 BLV proviral DNA의 존재 여부를 검사하기 위해서 김 등 [8] 및 Maniatis 등 [17] 방법을 응용하여 50  $\mu$ l 시스템에서 수행하였다. 약술하면, 증폭용 target DNA는 0.1~0.5  $\mu$ g/50  $\mu$ l, dNTP는 각각 200  $\mu$ M, 그리고 primer는 0.2  $\mu$ M/50  $\mu$ l을 최종 농도로 하였으며, *gag*, *env* 및 *pol* 유전자에 대한 primer를 각각 사용하였으며, 경우에 따라 한 개 이상의 primer를 동시에 사용하는 multiplex amplification을 시행하였고, automated thermal cycler (DNA thermal cycler 480, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT)를 사용하였다. PCR의 기본 parameter로는 95°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 그리고 72°C에서 30초간 (매 cycle 마다 2초씩 증가) extension으로 정하고, 증폭 cycle의 회수는 1단계에서 29-34 cycles, 2단계에 1 cycle로써 총 30-35 cycles로 하였으며, 2단계에서는 55°C에서 2분, 72°C에서 4분간 반응하였다. PCR 종료후 BLV 특이 provirus DNA의 존재를 확인하기 위해 PCR 증폭산물 15~20  $\mu$ l에 ethidium bromide를 가한 후 1% agarose gel에 전기영동하였다.

### 7. Syncytium assay (SA)

실험동물의 혈액과 조직내에 존재하는 BLV를 검출하기 위해 조 등 [6]의 방법을 응용하여 수행하였다. 약술하면, 분리된 말초임파구를 MEM 배지에  $3 \times 10^5$  cells/ml 농도로 조정하였다. 한편

Table 1. Oligonucleotide primers used for amplification of BLV proviral DNA

Amplified region in BLV genome	Primer sequence 5' → 3'	Location of primer in BLV genomic sequence	Predicted length of the amplified fragment (bp)
<i>gag</i> -p24	CTGACCTAGAACAACCTTTGC	1109-1218	226
	GACGAGTAGGGAGATTTTTCC	1315-1335	
<i>pol</i> (RT)	GTGTCCTATATGGACGATATCC	2791-2812	596
	AGTCTGCAGGTATTGGCATCC	3367-3387	
<i>env</i> -gp51 (I)	GTCTCCCAGATACACCTTGG	5042-5061	434
	GAAGGTTCCCAACATATAGC	5457-5476	
<i>env</i> -gp51 (II)	AGCCTTCAAATGCCTAAAGA	4812-4831	473
	AATCCATGACATTGTTTGA	5266-5285	



**Fig. 1.** Specificity of oligonucleotide primers for BLV proviral genes in PCR amplification. **A)** Lane 2, 3, 4 and 5: FLK-BLV cells, showing amplification of *gag* gene (226 bp), Lane 1: lymphocyte of normal goat, Lane 6: IBR virus, Lane 7: BGK cells, Lane M: marker ( $\lambda$ /HindIII +  $\phi \times 174$ /HaeIII digest mixture). **B)** Lane 1, 2 and 4: FLK-BLV cells, showing amplification of *gag* gene (226 bp), Lane 3 and 5: FLK-BLV cells, showing amplified *env* (434 bp) and *gag* genes by multiplex PCR, Lane 6: lymphocyte of normal goat, Lane 7: BGK cells, Lane M: marker ( $\phi \times 174$ /HaeIII digest).

**Table 2.** Detection of BLV proviral DNA and infective BLV in the peripheral blood lymphocytes from the Korean native goat experimentally infected with BLV by using PCR and syncytium assay

No. of goats	Age, Sex & Weights	Treatments	Weeks after BLV infection							
			1		4		8		16	
			PCR	SA	PCR	SA	PCR	SA	PCR	SA
I	55 days ♂, 7Kg	FLK-BLV ip-50 ml sc-20 ml	N/N <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	N/N	0	P/P	0	P/P	22
II	60 days ♂, 9Kg	"	N/N	0	N/P	0	P/P	12	P/P	38
III	55 days ♂, 8Kg	"	N/N	0	N/N	0	N/N	0	P/P	142
IV	60 days ♂, 10Kg	control	N/N	0	N/N	0	N/N	0	N/N	0
V	50 days ♂, 5Kg	control	N/N	0	N/N	0	N/N	0	N/N	0

<sup>a</sup> PCR was carried out using the primers for *pol* and *gag* genes: *pol/gag*. P= detected, N= not detected.

<sup>b</sup> Mean number of syncytium forming cells in each sample, estimated from triplicate.

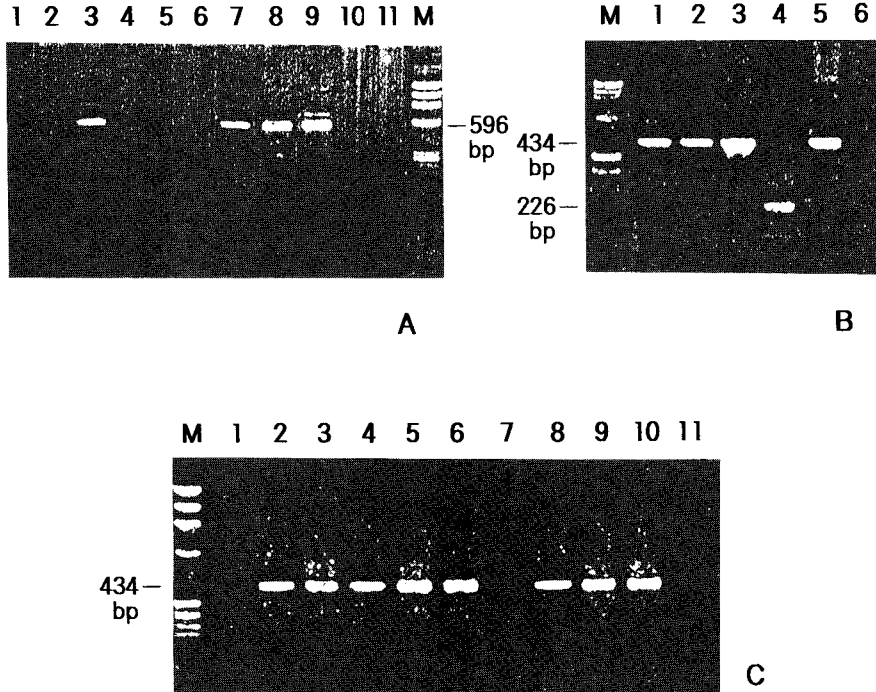
지시세포 F81 ( $3 \times 10^5$  cells/ml)을 multi-well cell culture plate (Falcon, 20 cm<sup>2</sup>/well)에 접종하고 CO 2 배양기에서 24시간 배양한 다음 DEAE-dextran 용액 (25  $\mu$ g/ml) 0.5 ml를 넣고 37°C에서 1시간 처리한 후 MEM 배지로 2회 세척하였다. 그리고 0.25% lactalbumin 또는 polybrene (2  $\mu$ g/ml)을 첨가한 배지 1 ml을 가하고 동시에 준비된 임파구 부유액 1 ml을 접종한 다음 37°C에서 7일간 공동 배양하고 Giemsa 염색을 수행하여 syncytium 형성 여부를 현미경으로 관찰하였다. 이때 5개 이

상의 핵을 가진 세포가 관찰되면 양성으로 판정하였다. 반응의 특이성은 임파구 부유액 접종시 BLV 양성혈청을 10%되게 첨가하여 syncytium 형성 저지 여부를 관찰하여 확인하였다.

## 결과 및 성적

### 1. Primer의 특이성

*Gag*, *pol* 및 *env* gene 영역에 대한 oligonucleotide primer의 특이성을 확인하기 위해 FLK-BLV 세



**Fig. 2.** Detection of BLV proviral genes in the various tissues obtained from the Korean native goats experimentally infected with BLV by using PCR amplification. **A)** Lymphocytes from the goats at the 8th week p. i. (Lane 3) and the 16th week p.i. (Lane 7, 8, 9) post infection, showing *pol* gene products (596 bp). Lane 1, 2, 4, 5, 6, 10 and 11: lymphocytes from the control goats. Lane M: marker ( $\phi \times 174/HaeIII$  digest). **B)** The tissues obtained at necropsy: Lane 1, 2, 3 and 5: superficial cervical lymph nodes of goat No I and II, showing amplified *env* gene, Lane 4: mandibular lymph nodes from goat No I, showing amplified *gag* gene, Lane 6: The tissues showing negative reactions. Lane M: marker ( $\phi \times 174/HaeIII$  digest). **C)** The tissues obtained at necropsy, showing amplified *env* gene (434 bp). Lane 2, 3 and 4: peripheral blood lymphocyte of goat No I, II and III, respectively, Lane 5: spleen of goat No II, Lane 6, 8, 9 and 10: mandibular lymph nodes from goat No I, II and III and retropharyngeal lymph node of goat No II, respectively, Lane 1, 7 and 11: The tissues showing negative reactions. Lane M: marker ( $\phi \times 174/HaeIII$  digest).

포, 재래산양 임파구, BGK 세포주 그리고 IBR virus를 공시하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 FLK-BLV 세포에서 226 bp의 *gag* gene이 특이하게 증폭되었고 (Fig. 1A), multiplex PCR에서는 *gag* gene과 434 bp의 *env* gene이 동시에 증폭되었다 (Fig. 1B). 또한 596 bp의 *pol* gene (Fig. 2A)과 473 bp의 *env* gene도 FLK-BLV 세포에서 특이하게 관찰되었다.

대조로 공시한 가검재료에서는 증폭산물이 관찰되지 않아 3개 gene에 대한 primer의 특이성이 인정되었다.

## 2. PCR의 민감성

확립된 PCR법에 의해 검출 가능한 DNA의 최소량을 측정하기 위해 FLK-BLV 세포의 chromosomal DNA를 10  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 100 ng, 10 ng 및 1

ng 용량으로 조정하여 PCR를 시행한 바 육안적으로 증폭산물을 인정할 수 있는 DNA 최소량은 10 ng이었다.

## 3. BLV 감염산양에 대한 PCR 및 SA시험

### (1) BLV 접종후 1주-8주

FLK-BLV를 접종한 산양에서 채취한 말초임파구에 대해 *pol* gene과 *gag* gene에 대한 primers를 이용한 PCR 시험결과 (Table 2), 접종후 1주에는 3두 모두 음성이었고, 4주째에는 II번에서 *gag* gene이 검출되었고, I번과 III번은 음성이었다. 8주째에는 I번과 II번 산양에서 *pol* 및 *gag* gene이 검출되었고, III번은 음성이었으며, 16주째 검사에서는 3두 모두 *pol*과 *gag* gene이 검출되었다. 또한 syncytium assay에서는 접종후 1주와 4주에서는 모두 음성이었으나 4주째에 II번 산양, 그리

**Table 3.** Detection of BLV proviral DNA and infective BLV in the various organs from the Korean native goat experimentally infected with BLV by using PCR and syncytium assay at necropsy at 8 months post-infection

	BLV-infected goats						Control			
	I		II		III		IV		V	
	PCR <sup>a</sup>	SA	PCR	SA	PCR	SA	PCR	SA	PCR	SA
Peripheral blood lymphocytes	P	27 <sup>b</sup>	P	96	P	112	N	0	N	0
Liver	N	0	N	0	N	0	N	0	N	0
Spleen	N	0	P	0	P	0	N	0	N	0
Kidney	N	0	N	0	N	0	N	0	N	0
Lymph nodes										
Superficial cervical	P	18	P	44	N	14	N	0	N	0
Mandibular	P	0	P	11	P	56	N	0	N	0
Retropharyngea	N	0	P	0	N	0	N	0	N	0
Mesentric	N	0	N	0	N	0	N	0	N	0

<sup>a</sup> PCR was carried out using the primers for *gag*, *env* and *pol* genes. P= detection of any one of three genes. N= not detected.

<sup>b</sup> Mean number of syncytium forming cells in each sample, estimated from triplicate.

고 16주째에는 BLV 접종 전두수에서 BLV가 인정되었다 (22-142). 시험기간 중 대조군 2두는 PCR과 SA 시험에서 모두 음성반응을 보였다.

#### (2) BLV 접종후 8개월

FLK-BLV를 접종한 산양을 접종후 8개월째에 도살하고 실질장기를 채취하여 전처리한 후 *gag*, *pol* 및 *env* gene primer를 이용하여 PCR을 수행하였고, 감염성 BLV의 유무를 SA법으로 검출하였다. 그 결과 (Table 3) PCR 시험에서 I번 산양은 말초임파구, 천경임파절 및 악하임파절에서 BLV 유전자가 검출되었고, II번 산양은 말초임파구, 비장 및 천경부, 악하 그리고 외측 인두후임파절에서 BLV 유전자가 검출되었다. 그리고 III번 산양은 말초임파구, 비장 및 악하임파절에서 BLV 유전자가 검출되었다.

SA 시험에서는 I번은 말초임파구와 천경임파절, II번과 III번 산양은 말초임파구, 천경임파절 및 악하임파절에서 감염성 BLV가 인정되었다. 대조군인 IV과 V번 산양은 모든 시험에서 음성이었다.

## 고 찰

BLV는 *Retroviridae*에 속하며 RNA 핵산을 가 지나 replication cycle 과정중 일단 세포에 침입하면 reverse transcriptase의 작용에 의해 provirus DNA를 형성하고, 이것은 숙주세포의 chromoso-

mal DNA에 결합하여 증식과정에 들어가는 성질을 가지고 있다 [1,2,7,18,19]. BLV proviral DNA는 2중 측쇄로 되어 있고, 8714 염기로 구성되며 양단에 530 염기의 long terminal repeat (LTR)이 있고, *Retroviridae*에 공통으로 존재하는 구조유전자인 *gag*, *pol* 및 *env*를 coding하고 있다 [1,2,7,18,19]. *Gag* 유전자는 group specific antigen 즉 virus core 단백을 coding하고, *pol* 유전자는 reverse transcriptase를, 그리고 *env* 유전자는 envelope glycoprotein을 coding한다. BLV proviral DNA에는 특수하게 *env*와 LTR사이에 *pXBL* 유전자로 coding하고 있다 [7,20]. 2개의 ORF를 갖는 이 유전자는 전사 활성화 인자에 대한 *tax*와 RNA processing을 제어하는 단백을 코딩하는 *rex* 유전자를 가지며 이들 유전자는 human T cell leukemia virus (HTLV)에서 공통적으로 관찰되는 특수한 것으로 밝혀져 있다 [1,2,7].

BLV는 젖소에서 혈액종양성 질병의 병원체로써 낙농산업에 경제적 손실을 야기하기 때문에 이에 대한 진단과 예방측면에서 많은 연구가 수행되었고, 특히 최근에는 BLV, HTLV 및 human immunodeficiency viruses 사이에 분자유전학적 유사성이 높다는 사실이 밝혀짐으로써 BLV에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다 [2,7,8,21]. 본 연구에서는 BLV에 대한 한국 재래산양의 감수성과 병인기전을 시험하고, 재래산양을 실험모델 동물로 이용할 수 있는지를 구명하기 위해 PCR

기법과 SA법으로 일련의 실험을 수행하였다.

PCR기법은 가검재료중에 극미량으로 존재하는 표적 DNA를 용이하게 검출할 수 있도록 표적 DNA의 단편을 특이적으로 증폭시켜 검출하는 방법으로 민감성과 특이성이 매우 높아 핵산 관련 제반 기법에서 뿐만아니라 미생물의 감염 상태를 진단하거나 미생물의 병인기전을 연구하기 위한 수법으로 널리 이용되고 있다 [8,17]. 그러나 PCR 기법의 민감성과 특이성을 높이기 위해서는 반응조건이 표준화가 선행되어야 하고, 본 시험에 앞서 특이성에 대한 확인시험이 수행되어야 한다 [17].

본 시험에서 사용한 primers와 PCR 조건은 Fig. 1에서 기술한 바와 같이 BLV가 감염되어 있는 FLK 세포주에서만 BLV 유전자가 특이하게 증폭되어 특이성이 매우 높은 것으로 간주되지만, 대조바이러스로 HTLV나 avian leucosis virus와 같이 유전적 성상이 유사한 바이러스에 대한 특이성시험과 Southern blotting을 하여 PCR products의 정상 확인시험이 부수되어야 하지만, 본 시험에서는 4가지 primers를 다양하게 응용함으로써 이 문제를 극복하고자 하였다. 본 실험에서 이용된 PCR의 민감성은 FLK-BLV 핵산 10 ng이 검출한계점으로 나타나 chromosomal DNA 중 proviral DNA의 양은 약  $10^{-6}$  정도로 유추된다.

한국재래산양의 BLV 감염에 대한 감수성은 조 등 [6] 및 이 등 [4]이 혈청학적 검사와 혈액학적 실험을 통하여 입증한 바 있었다. 그러나 본 시험에서 PCR법과 SA법 [22]을 병행하여 수행한 바 PCR법에 의해서는 접종 4주째부터 말초임파구에 BLV 핵산이 검출되었고, SA법으로는 접종 후 8주째에 미약한 양성반응이 인정되었으며, 감염 후 16주째에는 3두 모두 *pol*과 *gag* gene이 PCR법에 의해 검출되었고, SA법에 의해서 강한 양성반응 (22-142)이 관찰되어 BLV proviral DNA의 검출과 감염성 BLV의 검출에는 약 4주 정도의 차이가 있다는 사실이 판명되었다.

Ohtsu 등 [23]은 Corridale과 Suffolk종 양에 BLV를 접종하였을 때 2~4년이 경과한 후에 임파육종 소견이 관찰되었다고 보고한 바 있으며, 면양은 BLV에 감수성이 가장 높은 실험동물이라고 지적하였다 [24]. 본 시험에서 BLV 감염 후 8개월째에 실험도살한 산양의 육안적 부검소견에서는 특이한 병변이 관찰되지 않았다. 각 장기별 BLV 감염실태를 조사한 바 (Table 2) 말초임

파구에는 전두수에서 BLV proviral DNA와 감염성 BLV가 인정되었으나 간, 비장 및 신장에서는 II번 산양의 비장을 제외하고는 검출되지 않았다. 또한 임파절에 대한 실험에서는 천경부임파절, 악하임파절에서 양성빈도가 높았다. 또한 3두의 산양 중 II번 산양이 장기별 BLV 발현빈도가 가장 높았다. 이와같은 일련의 실험에서 말초임파구에서 지속적으로 BLV proviral DNA를 검출할 수 있다는 사실은 산양에서도 젖소에서처럼 BLV의 말초임파구 감염이 병인기전에 중요한 부분을 차지한다는 사실을 뒷받침한다고 생각된다 [8]. 또한 이 등 [4]이 BLV에 인공감염된 산양에서 접종 후 12개월부터 BL-TAA 양성 임파구가 증가하고 18개월에 임파구증가증이 관찰되었고, bovine leukaemia-tumor associated antigen을 가진 임파구, surface Ig 양성세포와 B-임파구의 수가 증가되는 경향이 있다고 보고한 결과와 비교할 때 PCR기법에 의한 proviral DNA 검출법은 혈액학적 검사법에 비해 효과적이라고 사료된다.

본 시험결과 이 방법으로 산양에 대한 BLV의 조직내 감염경로를 부분적으로 알 수 있었고, 재래산양은 BLV 감염시험모델로 이용될 수 있음이 입증되었다. 그러나 재래산양이 BLV에 감염되어 중앙병변을 일으키는지 여부를 확인하기 위해서는 보다 장기적인 추가시험이 요망된다.

## 결 론

한국 재래산양에 bovine leukemia virus를 인공감염시키고 PCR법과 syncytium assay (SA)법으로 감염기간 및 장기별로 BLV proviral DNA를 검출하고 감염성 BLV를 측정함으로써 BLV의 재래산양에 대한 병인기전을 밝히고, BLV 감염시험 모델을 확립하기 위한 기초자료를 얻고자 일련의 시험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) PCR에 사용된 oligonucleotide primers는 BLV의 *gag*, *pol* 및 *env* gene에 대해 특이성이 높았으며, FLK-BLV 세포의 chromosome에 통합된 BLV proviral DNA 검출한계는 10 ng이었다.

2) BLV에 실험적으로 감염된 산양의 말초임파구에 대해 PCR법과 SA법으로 BLV 감염상태를 시험한 바, PCR법에서는 접종 후 1주째에는 전두수가 음성이었고, 4주째에 3두중 1두에서 *gag* gene이 검출되었고, 8주째에는 3두중 2두 그리고 16주째에는 3두 모두에서 *pol* 또는 *gag* gene이 검

출되었으며, SA법에서는 접종후 8주째부터 감염성 BLV가 검출되었고, 16주째에는 전두수가 22-142의 검출율을 나타내었다.

3) 접종후 8개월째에 도살된 모든 산양의 말초 림파구에서 BLV proviral DNA 및 감염성 BLV가 검출되었으며, 장기별로는 비장, 천경부림파절, 악하림파절 및 외측인두후림파절에서 BLV proviral DNA 및 BLV가 검출되었고, 감염성 BLV는 천경부림파절과 악하림파절에서 인정되었다. 간, 신장 및 장간막림파절에서는 검출되지 않았다.

### 참 고 문 헌

1. Burny A, Bruck C, Chantrenne H, Cleuter Y, Dekegel D, Ghysdael J, Kettmann R, Leclercq M, Leunen J, Mammerickx M, Portetelle D: Bovine leukemia virus. Molecular biology and epidemiology. p.231-289. In Klein G (ed.), Viral oncology, Raven Press, New York, 1980.
2. Burny A, Mammerickx M: Enzootic bovine leukaemia and bovine leukemia virus. Martinus Nijhoff Publishing, Lancaster, 1-160, 1987.
3. Gillespie JH, Timoney JF: Hagan and bruner's infectious diseases of domestic animals. Comstock, Cornell Univ press, USA, 1981.
4. Lee, Pil D, Kim, Jong H, Jun, Moo H: Hematological change of Korean native goats experimentally infected with bovine leukemia virus. Korean J Vet Serv 18: 1-21, 1995.
5. Jun, Moo H, Chung, Un I, An, Soo H: Studies on bovine lymphosarcoma. III. Preparation of bovine leucosis virus antigens and its biological properties. Res Rep ORD 25: 68-74, 1983.
6. Cho, Young S, Jun, Moo H, Chang, Kyung S, Choi, Young D: Infectivity of bovine leukemia virus to Korean native goats. I. Antibody responses and syncytium assay for Korean native goats experimentally infected with bovine leukemia virus. J Kor Soc Virol 23: 153-163, 1993.
7. Aida Y, Ohishi K, Ikawa Y: Experimental BLV-induction of leukemia in sheep as a model for ATL and development of BLV vaccine. Exp Med 11: 65-75, 1993.
8. Kim, Uh H, Ra, Chang S, An, Soo H, Yoon, Ji B: Studies on the amplification and detection of bovine leukemia proviral DNA by PCR and ECL techniques. J Kor Soc Virol 22: 1-11, 1992.
9. Jun, Moo H, Kim, Duck H, Choi, Young D, Cho, Young S, Park, Jeong W, Park, Jong H: Study on tumor-associated antigens expressed on the lymphocytes from cattle infected with bovine leukemia virus by using monoclonal antibody. J Kor Soc Virol 22: 129-138, 1992.
10. Bansal MP, Singh KP: Infectivity of bovine leukemia virus to rabbits, lambs, rats. Curr Sci 49: 567-569, 1980.
11. Hoss HE, Olson C: Infectivity of bovine C-type (leukemia) virus for sheep and goats. Am J Vet Res 35: 633-637, 1974.
12. Mammericks M, Portetelle D, Burny A: Experimental cross-transmission of bovine leukemia virus (BLV) between several animal species. Zentralbl Veterinaermed Reihe B 28: 69-81, 1981.
13. Onuma M, Wada M, Yasutomi Y: Suppression of immunological responses in rabbits experimentally infected with bovine leukemia virus. Vet Microbiol 25: 131-141, 1990.
14. Gatei MH, Naif HM, Kumar S: Protection of sheep against bovine leukemia virus (BLV) infection by vaccination with recombinant vaccinia viruses expressing BLV envelope glycoproteins. Correlation of protection with CD4 T-cell response to gp51 peptide 51-70. J Virol 67: 1803-1810, 1993.
15. Sagata N, Ogawa Y, Kawamura J: Molecular cloning of bovine leukemia virus DNA integrated into the bovine tumor cell genome. Gene 26: 1-10, 1983.
16. Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuku-kawamura J: Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus. Its evolutionary relationship to other retroviruses. Proc Natl Acad Sci USA 82: 677-681, 1985.
17. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.
18. Haas L, Divers T, Casey JW: Bovine leukemia virus gene expression in vivo. J Virol 66: 6223-



- 6225, 1992.
19. Rice NR, Stephens RM, Burny A: The *gag* and *pol* genes of bovine leukemia virus nucleotide sequence and analysis. *Virology* 142: 357-377, 1985.
  20. Itohara S, Tomiyama T, Ushimi C: Cooperative regulation of bovine leukemia virus gene expression by two overlapping open reading frames in the XBL region. *J Gen Virol* 69: 797-804, 1988.
  21. Jun MH, Chung UI, Lee CK: Seroepizootiological study on bovine leucosis in Korea. *Kor J Vet Res* 22: 175-185, 1982.
  22. Onuma H, Watarai S, Sonoda H: Detection of bovine leukemia virus by syncytium assay. *Can J Comp Med* 44: 289-293, 1980.
  23. Ohtsu Y, Tsutsumi M, Okada K: Histopathological study on experimental ovine lymphosarcoma by bovine leukemia virus. *J Facul Agric, Iwate Univ* 20: 315-327, 1992.
  24. Ohshima KI, Aida Y, Kim JC: Histopathology and distribution of cells harboring bovine leukemia virus (BLV) proviral sequences in ovine lymphosarcoma induced by BLV inoculation. *J Vet Med Sci* 53: 191-199, 1991.
-